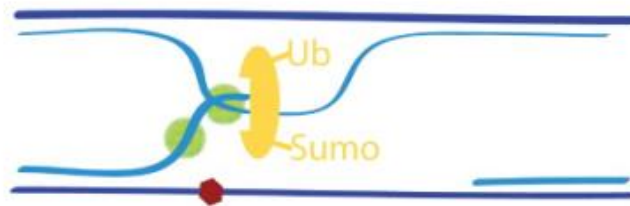




Estudio de las funciones replicativas de Rad51 durante la tolerancia a daños replicativos



GRADO EN BIOMEDICINA BÁSICA Y EXPERIMENTAL

UNIVERSIDAD DE SEVILLA

Facultad de Medicina

Autora: Marta Vicioso Mantis

Tutor: Félix Prado Velasco

Tutor: Pablo Huertas Sánchez



Estudio de las funciones replicativas de Rad51 durante la tolerancia a daños replicativos

Trabajo Fin de Grado Experimental

Febrero 2016-Mayo 2016

GRADO EN BIOMEDICINA BÁSICA Y EXPERIMENTAL

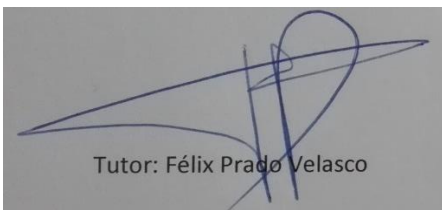
UNIVERSIDAD DE SEVILLA

Facultad de Medicina

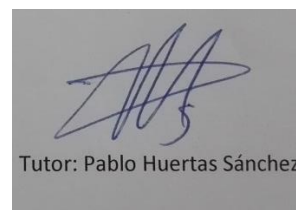
Centro Andaluz de Biología Molecular y Medicina Regenerativa (CABIMER)

Departamento de Biología Molecular, grupo “Integridad y función de la cromatina”

Autora: Marta Vicioso Mantis



Tutor: Félix Prado Velasco



Tutor: Pablo Huertas Sánchez

ÍNDICE

1.- RESUMEN.....	4
2.-PALABRAS CLAVES.....	4
3.-INTRODUCCIÓN.....	5
4.-MATERIALES Y MÉTODOS.....	11
5.-RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	18
6.-CONCLUSIONES.....	29
7.-BIBLIOGRAFÍA.....	30

1.-RESUMEN

La proteína de recombinación homóloga Rad51 desempeña un papel clave en la respuesta de tolerancia al daño en el ADN. Esta viaja con la horquilla de replicación tanto en ausencia como en presencia de daño, de tal manera que cuando lo hay promueve la replicación ayudando a saltar lesiones bloqueantes, proceso que deja regiones de ADN de cadena simple tras la horquilla que serán luego reparadas en G2/M. Esto sugiere que Rad51 tiene funciones replicativas y reparacionales diferenciadas y reguladas espacio-temporalmente, aunque acopladas mecanísticamente. Con el objetivo de definir estas actividades adecuadamente, en el laboratorio del Dr. Prado se han buscado mutantes de *RAD51* de separación de funciones, consiguiéndose aislar 7 mutantes afectados principalmente en la función replicativa. El objetivo de este trabajo ha sido caracterizarlos genética y molecularmente. Para ello, en primer lugar hemos clonado los alelos de *rad51* mutantes y hemos analizado su sensibilidad a los agentes genotóxicos MMS, radiación γ , zeocina e hidroximetilurea, obteniendo varios grados de sensibilidad/resistencia a los mismos; posteriormente, hemos estudiado su ciclo celular mediante análisis de la concentración de ADN por FACS, si bien este ensayo no ha sido concluyente; finalmente, hemos caracterizado las mutaciones del gen *RAD51* de cada uno, y a raíz de los resultados obtenidos hemos planteado un ensayo de doble híbrido para estudiar la interacción de Rad51 con Rad54, la cual podría verse interrumpida por algunas de las mutaciones encontradas. En cualquier caso, se debe profundizar la caracterización aquí iniciada ya que sigue sin conocerse la causa de los problemas replicativos de estos mutantes.

2.-PALABRAS CLAVE

RAD51, daños replicativos, DDT (DNA Damage Tolerance), TS (Template Switch), HR (Homologous Recombination).

3.- INTRODUCCIÓN

Las células acumulan daños en el ADN tras cada ciclo, los cuales pueden ser inducidos tanto por compuestos derivados del metabolismo celular como por agentes externos (compuestos alquilantes y oxidantes, radiaciones ultravioleta y gamma, etc.) (1–3). Por este motivo, las células poseen numerosos mecanismos de reparación para mantener la integridad genómica. Estos son específicos del tipo de lesión del ADN al que hagan frente: reparación por escisión de nucleótidos (NER, Nucleotide Excision Repair), que actúa sobre los aductos generados, por ejemplo, por radiación ultravioleta; reparación por escisión de bases (BER, Base Excision Repair), cuyo foco de actuación son las bases alquiladas o los sitios abásicos; reparación de rotura de cadena sencilla (SSBR, Single-Strand Break Repair); Recombinación Homóloga (HR, Homologous Recombination), que actúa tanto sobre cortes de ADN de cadena sencilla como de doble cadena (DSB, Double Strand Break); ligación de extremos no homólogos (NHEJ, Non-Homologous End Joining), que también repara los DSB (4). Estos mecanismos deben estar altamente regulados, ya que pueden dar lugar a intercambios entre secuencias homólogas, reordenamientos genómicos y acumulación de mutaciones que en conjunto podrían generar inestabilidad genética, la cual está íntimamente asociada al cáncer y otras enfermedades genéticas (1,5,6).

La HR se ha estudiado principalmente durante la reparación de DSB, aunque parece que la mayoría de eventos de HR espontáneos son iniciados por daños replicativos que no son DSB (7). En el caso de los DSB, la reparación se inicia mediante la resección de los extremos 5' de la lesión para generar moléculas de ADN de cadena simple (ssDNA), las cuales constituyen unos intermediarios comunes a todos los procesos de recombinación (Figura 1). En la resección participan el complejo MRX/N, la nucleasa Exo1 y la helicasa/nucleasa Sgs1/Dna2. A continuación, las proteínas Rad52 y BRCA2 cargan Rad51 en este ssDNA de extremo 3'OH, de tal manera que se forma un nucleofilamento Rad51/ssDNA, el cual es responsable de la búsqueda de homología e invasión de la secuencia homóloga que se va a usar para reparar el DSB. Esta invasión da lugar a la formación de un lazo en D (D-loop), que es luego alargado tanto por el proceso de síntesis de ADN como por el intercambio de cadena (Figura 1). Posteriormente esta estructura es resuelta a través de varias posibles vías (8).

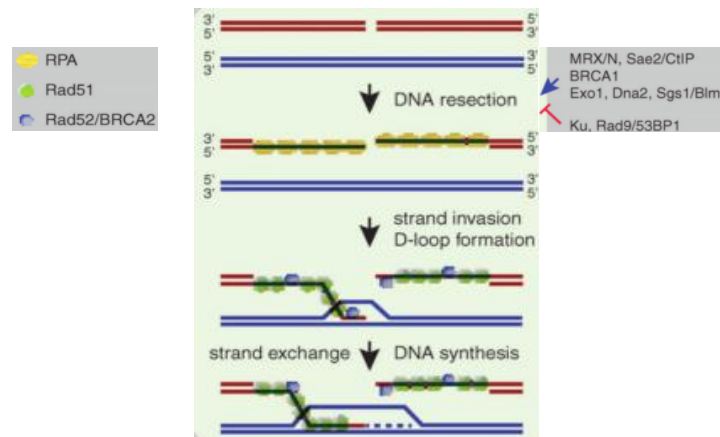


Figura 1. Proceso de reparación de DSB por HR.

Por tanto, la proteína Rad51, y sus mediadores Rad52 y BRCA2, son esenciales en todos los procesos de HR. Rad52 y BRCA2 participan en el reclutamiento de Rad51 al fragmento de ssDNA de extremo 3'OH, tanto mediante interacciones físicas como compitiendo y desplazando a la proteína de unión a cadena sencilla, RPA (9,10). Por su parte, Rad51 es una ATPasa dependiente de ADN implicada en la búsqueda de homología e invasión. Es homóloga de la proteína RecA bacteriana, y está conservada desde levaduras a humanos (10,11). En *S.cerevisiae*, Rad51 es una proteína de 400 aminoácidos en la que hay dos dominios principales descritos: un dominio Helix-hairpin-Helix (HhH, del residuo aminoacídico 86 al 137), que constituye el dominio de unión a ADN de doble cadena (dsDNA), y un dominio RecA/Rad51 (del residuo 141 al 395) en el cual residen las actividades ATPasa, helicasa y de unión a ssDNA. De hecho, este dominio es compartido por numerosas ATPasas y helicases. En este se encuentran, a su vez, dos dominios de unión a ATP denominados Walker A (del residuo 184 al 192) y Walker B (del residuo 274 al 280) (Figura 2). Asimismo Rad51 interacciona consigo misma para la formación del nucleofilamento en un dominio estructural de polimerización, el cual se encuentra entre los otros dos dominios (12,13).

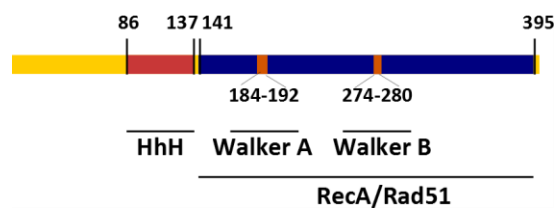


Figura 2. Dominios descritos de Rad51

A pesar de todos estos mecanismos de reparación, en numerosas ocasiones la horquilla de replicación llega a la lesión antes de que ésta sea reparada. Muchas de estas lesiones pueden dificultar el avance de la horquilla, y por tanto amenazar la finalización de la replicación a tiempo. Ante esta situación existen dos posibilidades: o bien se repara la lesión, asegurando la fidelidad en la replicación pero pudiendo extender demasiado la fase S y generar inestabilidad genética, o bien se tolera la lesión saltándola y produciendo regiones de ssDNA que deben primero ser rellenadas y luego reparadas. Por tanto, esta opción prioriza completar el ciclo posponiendo la reparación de los daños que interfieren con la replicación. Así asegura la replicación a tiempo, aunque pueda dar lugar a mutagénesis y reordenamientos genómicos (14).

La respuesta de tolerancia al daño (DDT, DNA Damage Tolerance) comprende dos mecanismos principales de avance sobre el ADN dañado y relleno de los fragmentos de ssDNA generados tras este avance: La ruta de Síntesis Translesión (TLS, Translesion Synthesis), y la ruta de Cambio de Molde (TS, Template Switch). La TLS es una ruta que rellena el fragmento de ssDNA utilizando como molde la cadena dañada, mientras que la TS usa como molde para evitar la lesión la cromátida hermana (Figura 3). La decisión de qué ruta actuará es determinada por el factor de procesividad de la polimerasa (PCNA). En respuesta a daño PCNA es monoubiquitinado en el residuo lisina 164 por el complejo ubiquitina ligasa Rad6/Rad18, lo que promueve el reclutamiento de polimerasas de TLS; éstas son capaces de incorporar un nucleótido frente a una base dañada o ausente, y por lo tanto son mutagénicas. Adicionalmente, la lisina 164 ubiquitinada puede ser extendida por el complejo ubiquitina-ligasa Ubc13/Mms2/Rad5 para promover la ruta de TS (Figura 3) (15). Las proteínas de HR, entre ellas Rad51 y Rad52, participan en este proceso de TS, probablemente aportando las funciones de intercambio de cadenas (16–18). El hecho de que esta ruta use la información genética de una molécula intacta para reparar el fragmento de ssDNA la convierte en una ruta libre de errores. Por tanto, la elección entre TLS o TS determina si la reparación es mutagénica o no, lo cual hace de la DDT un proceso esencial para la integridad genómica. La TS es la vía mayoritaria y opera preferentemente durante la fase S, mientras que la TLS suele estar confinada a G2 para actuar sobre lesiones que permanecen sin reparar (19).

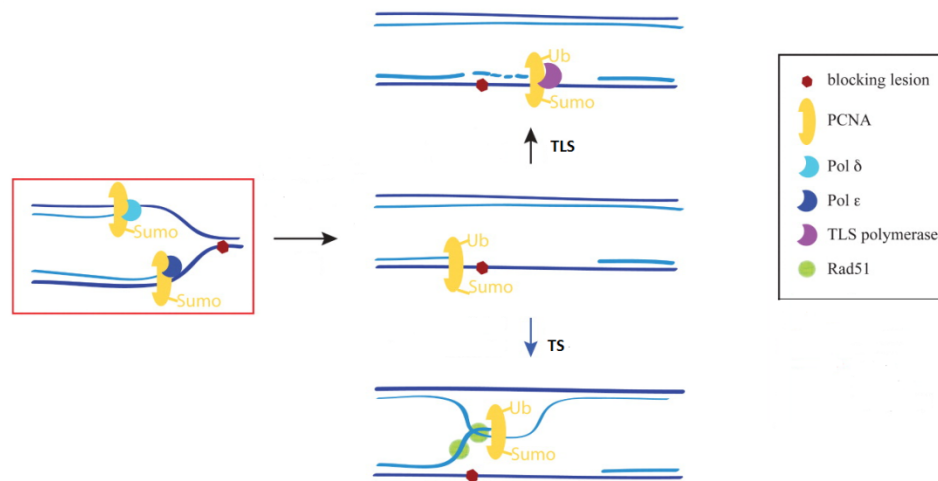


Figura 3. Mecanismos principales de DDT.

Existe una segunda vía de TS independiente de Rad5 y dependiente, asimismo, de la maquinaria de HR. Durante la fase S, tanto en ausencia como en presencia de daño, esta vía queda inhibida por una segunda modificación de PCNA: la sumoilación de las lisinas 164 y 127 por el complejo Ubc9/Siz1 (15). Esta señal recluta a la helicasa Srs2, la cual promueve el desmantelamiento del nucleofilamento de Rad51/ssDNA y de los D-loops generados durante el proceso de invasión de la cromátida hermana, previniendo de esta manera eventos de recombinación no deseados durante la replicación (20–22).

Estudios en *S.cerevisiae*, *Xenopus* y líneas celulares humanas han demostrado que Rad51 y Rad52 viajan con la horquilla de replicación, tanto en ausencia como en presencia de daño (23–26). En condiciones de daños replicativos, como los generados por radiación ultravioleta o por el agente alquilante metil-metano sulfonato (MMS), estas proteínas promueven la replicación ayudando a saltar lesiones bloqueantes que dejan regiones de ssDNA tras la horquilla que serán reparadas por los mecanismos de TS mencionados (25,27,28).

El checkpoint replicativo, activado por la acumulación de ssDNA, y la actividad quinasa dependiente de ciclina (CDK, Cyclin Dependet Kinase) de Cdc28 son los encargados de regular la reparación recombinacional durante la DDT, restringiendo el ensamblaje de los centros de reparación a G2/M. Por tanto, y a pesar de que las proteínas de HR están unidas tanto a las horquillas como a las lesiones de ssDNA durante la fase S, la reparación no se produce hasta G2/M (25). En mutantes defectivos en el checkpoint replicativo los centros de reparación se ensamblarían prematuramente en horquillas estresadas, interfiriendo con la replicación del

ADN y promoviendo reordenamientos por eventos de recombinación aberrantes (Figura 4) (29).

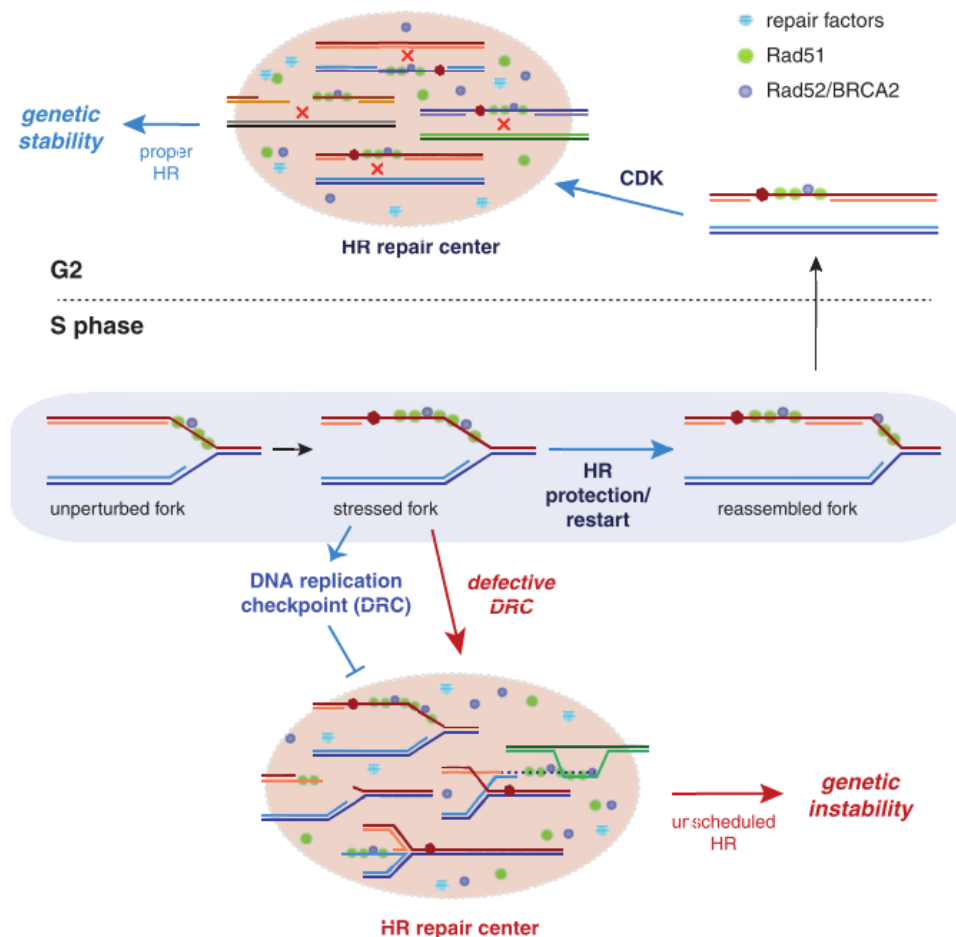


Figura 4. Regulación de la reparación recombinacional durante la DDT por el checkpoint replicativo y la actividad CDK de Cdc28.

Por tanto, todos estos datos sugieren que las proteínas de HR Rad51 y Rad52 tienen funciones tanto replicativas (durante la fase S) como reparacionales (durante G2/M), diferenciadas y reguladas espacio-temporalmente. Estas funciones están, no obstante, acopladas mecánicamente, como sugiere el hecho de que la restricción de la expresión de Rad52 a G2/M impide la unión y posterior reparación por Rad51 de los ssDNA (25). Este hecho marca una distinción fundamental entre la DDT y la HR inducida por DSB, en la cual las proteínas de recombinación son reclutadas a la lesión independientemente de la replicación (27,30), y en consecuencia pueden reparar DSBs generados en fase S aunque la expresión de Rad52 ocurra sólo en G2/M (25).

Con el objetivo de definir estas actividades adecuadamente, en el laboratorio del Dr. Prado se han buscado mutantes de *RAD51* de separación de funciones. Para ello, se realizó una PCR mutagénica del gen *RAD51*, de tal manera que incorporara mutaciones que pudieran afectar a una de las dos funciones exclusivamente. A continuación se procedió a la construcción de una genoteca de mutantes “*in vivo*” en *S.cerevisiae*, aproximación basada en la reparación por HR de un corte de doble cadena en la región codificante de *RAD51* con los productos de la PCR mutagénica (Figura 5). Tras un escrutinio de 2.056 candidatos en el que se analizó la sensibilidad a MMS y radiación γ , se aislaron 67 mutantes sensibles a MMS y/o radiación γ , de los cuales 7 presentaba un fenotipo de sensibilidad a MMS (que dificulta el avance de la horquilla, generando estrés replicativo) y resistencia a radiación γ (que causa DSB), lo que sugiere que están afectados principalmente en la función replicativa (39).

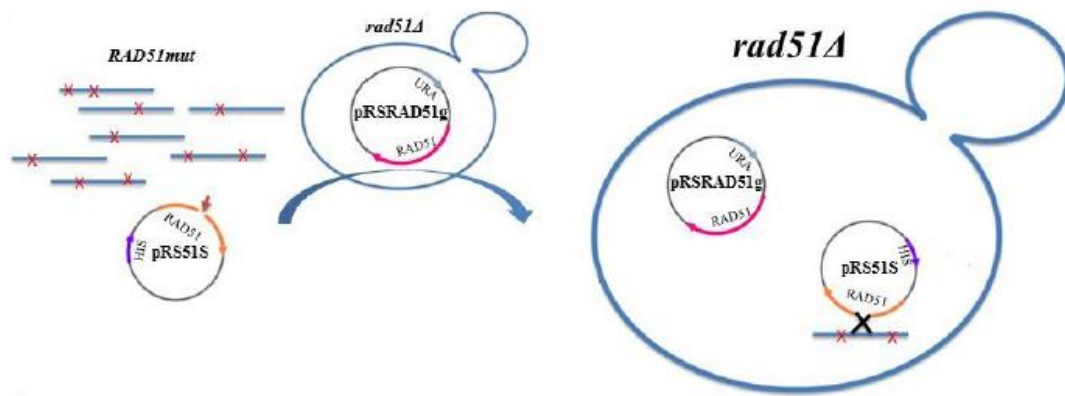


Figura 5. Estrategia seguida para la construcción de la genoteca “*in vivo*” de mutantes de *RAD51*. La estirpe Wrad51Δ-2 fue transformada con el producto de la PCR mutagénica y el plásmido pRS51S, que contiene el marcador *HIS3* y una copia de *RAD51* digerida por la enzima *EcoRI*. Se transformó también con el plásmido pRSRAD51g, que contiene el marcador *URA3* y una copia totalmente funcional de *RAD51*, para que la estirpe fuera funcional para HR y pudiera reparar el corte de *RAD51* con el producto de la PCR mutagénica. Este plásmido fue contraseleccionado sembrando las células en medio con ácido 5-fluorótico (FOA). Las transformantes que crecieron en medio –H y FOA fueron posteriormente analizadas para su sensibilidad a MMS y radiación γ .

El objetivo de este trabajo ha sido caracterizar genética y molecularmente a estos mutantes.

4.-MATERIALES Y MÉTODOS

4.1. Estirpes y condiciones de cultivo

Las estirpes empleadas en el estudio están recogidas en la tabla M1. La estirpe de levadura Wrad51Δ-2 se incubó a 30º con agitación suave, en placas o medio líquido de medio mínimo sintético sin histidina (SMM-H) o medio rico (YPAD) (31). Por su parte, *E. coli* DH5α se incubó a 37º con agitación suave en medio LB+Ampicilina (Ap, 100 µg/mL) (31).

Para los estudios de sensibilidad a agentes genotóxicos, las células se crecieron en placas de medio SMM-H al que se añadió MMS (Sigma-Aldrich, 1.3 g/mL) o hidroximetilurea (HU, USBiological-Life Sciences, Pm= 76.06 g/mol). Para las placas de medio YPAD con zeocina™ (Invitrogen-Thermo Fisher Scientific, 100 mg/mL), el pH se ajustó primero a 7.4 y luego se añadió la droga.

La sincronización de las células en G1 se realizó incubando las muestras a 30ºC en agitación durante 2 horas con 10 µL de α factor (1 mg/mL), añadido al principio y tras la primera hora. Para la liberación de la parada en G1 las células se lavaron tres veces con medio fresco, y se resuspendieron finalmente en medio con pronasa a 1 µL/mL.

Tabla M1. Estirpes empleadas en el estudio.

Estirpe	Genotipo relevante	Fuente
Wrad51Δ -2	<i>MATa leu2-3 112 trp1-1 ura3-1 ade2-1</i> <i>can1-100 his3-11, 15 RAD5 bar1Δ::hisG</i> <i>rad51Δ::kan</i>	Roldán, Morillo y Prado, 2015 (TFM J.M.Roldán) (39)
<i>E.coli</i> DH5α	<i>f-endA1 gyrA96 hsdR17 lacU16Δ</i> <i>9 (f80lacZΔM15) recA1 supE44 thi-1</i>	Hanahan D, 1983 (32)

4.2. Plásmidos

Tabla M2. Plásmidos empleados en el estudio.

Plásmido	Características	Fuente
pRS51S	Plásmido de expresión de <i>RAD51</i> (<i>HIS3</i> , <i>CEN6 ARSH4</i> , <i>Amp^r</i>)	Prado F (no publicado)
pRS313	<i>HIS3</i> , <i>CEN6 ARSH4</i> , <i>Amp^r</i>	Sikorski RS & Hieter P, 1988 (33)

4.3. Transformación de bacterias

La transformación de bacterias con los plásmidos extraídos de levaduras, así como con el plásmido pBR322 (15 pg/mL), se realizó incubando en hielo durante 30 minutos 100 µL de bacterias competentes DH5α con 5 µL de ADN de plásmido. Luego se sometieron a un choque térmico a 42°C durante 1 minuto, se pasaron a hielo durante 2 minutos, fueron incubadas a 37° en agitación durante 45 minutos y, finalmente, fueron sembradas en placas LB+Ap para seleccionar los transformantes.

4.4. Transformación de levaduras

La transformación de levaduras con los plásmidos extraídos de bacterias se realizó a partir de cultivos de levaduras inoculados de colonias individuales en medio YPAD, que se incubaron hasta alcanzar una $D.O_{660nm} = 0.4-0.6$. Las células se recogieron y se centrifugaron a 4000 rpm durante 3 minutos, se lavaron con agua destilada, se volvieron a centrifugar a 4000 rpm durante 3 minutos y se lavaron con 5 mL de AcLi1x TE1x (tabla M4) para permeabilizar las membranas. El pellet se mezcló posteriormente con 240 µL de PEG 50%, 36 µL de AcLi 10x, 10.34 µL de ADN de esperma de salmón (5.8 mg/mL) previamente desnaturalizado a 100°C durante 6 minutos, 4 µL de ADN y agua destilada hasta un volumen de 360 µL. A continuación las muestras se vortearon durante 10-15 segundos, se dejaron a 30°C en agitación durante 30 minutos, se sometieron a un choque térmico a 42°C durante 20 minutos, se lavaron con agua destilada y se centrifugaron a 6000 rpm durante 1 minuto. Finalmente, las muestras se sembraron en placas adecuadas para realizar la selección de los transformantes (34).

Tabla M4. Solución AcLi1x TE1x

AcLi1x TE1x
2.5 mL TE 10x
2.5 mL AcLi 10x
20 mL agua destilada

4.5. Extracción de ADN

4.5.1. Extracción de plásmidos de bacterias

La extracción de los plásmidos de *E.coli* se realizó siguiendo protocolos tanto de miniprep como de midiprep (31). Para la miniprep las células de colonias individuales se incubaron en 5 mL de LB+Ap durante la noche (O/N), y al día siguiente se recogieron por centrifugación a 13.000 rpm durante 1 minuto, se resuspendieron en 100 µL de solución I (tabla M3), y se incubaron durante 5 minutos a temperatura ambiente; posteriormente se añadieron 200 µL de solución II (preparada en el momento, tabla M3), y se incubaron durante 5 minutos en hielo; finalmente se añadieron 150 µL de solución III (tabla M3), y se incubaron durante 5 minutos en hielo. Las muestras se centrifugaron a máxima velocidad durante 5 minutos, se aislaron los sobrenadantes y se fenolizaron con 1 volumen de fenol-cloroformo isoamílico (25:24:1) para extraer el ADN de la fracción proteica. A continuación las muestras se centrifugaron a máxima velocidad durante 5 minutos, se aisló el sobrenadante, y se precipitó el ADN con etanol 96% durante 20 minutos a -20°C. El pellet se lavó con etanol 70%, y se resuspendió en 20 µL de TE 1x. Para la midiprep se partió de 50 mL de LB+Ap, escalándose proporcionalmente los volúmenes de las soluciones correspondientes. El ADN se resuspendió en 300 µL de TE 1x.

4.5.2. Extracción de plásmidos de levaduras

La extracción de los plásmidos de levadura se realizó a partir de cultivos de levaduras inoculadas de colonias individuales en medio SMM-H, que se incubaron hasta alcanzar una $D.O_{660nm} = 0.9-1$. Se recogieron y se centrifugaron a 4.000 rpm durante 1 minuto, se lavaron con agua Milli-Q® y se resuspendieron en 0.64 mL de 0.9 M sorbitol-0.1 M EDTA (tabla M3), 6.4 µL de β-mercaptoetanol (1/10) y 20 µL de zimoliasa 20-T (15mg/mL). Las muestras se incubaron 1 hora a 37°C, invirtiendo cada 15 minutos. Los esferoplastos generados tras la degradación de la pared celular por la zimoliasa se recogieron por centrifugación a 4.000 rpm

durante 1 minuto, y se resuspendieron en 200 μ L de solución I de miniprep de bacterias, continuándose con este protocolo (ver punto 4.5.1.) hasta resuspender el ADN final en 20 μ L de TE1x.

Tabla M3. Soluciones empleadas para la extracción de ADN

Solución I	Solución II (miniprep, 24 muestras)	Solución II (midiprep)	Solución III	Solución sorbitol- EDTA
5mL glucosa 1 M	500 μ L SDS 10%	500 μ L SDS 20%	60mL Kac 5 M	90mL sorbitol 2M
2.5mL tris 1M pH 8	100 μ L NaOH 10M	200 μ L NaOH 10M	11.5mL ácido acético glacial	40mL EDTA 0.5M
2mL EDTA 0.5M pH 8	4.4mL H ₂ O Milli- Q®	9.3mL H ₂ O Milli-Q®	28.5mL H ₂ O Milli-Q®	H ₂ O Milli-Q® hasta 200mL
90.5mL H ₂ O Milli-Q®				

Las muestras de ADN extraído, independientemente del protocolo, se incubaron con RNasa (10 mg/mL) a 37°C durante 45 minutos para eliminar el ARN. Luego se realizó una extracción con fenol-cloroformo isoamílico (25:24:1), y se precipitó el ADN con etanol 96% y NaCl 0.3 M a -20°C durante 30 minutos, tras lo cual se lavó con etanol 70%, y se resuspendió en TE 1x o agua Milli-Q®.

4.6. Secuenciación

Para la secuenciación las preparaciones de ADN se trataron con RNasa (10 mg/mL), y se analizaron mediante electroforesis (EPS 301-Amersham Biosciences) en gel de agarosa al 0.8% y medición de la D.O._{260/280nm} en un NanoDrop® (Spectrophotometer ND-1000), con el cual se determinaron la concentración y la limpieza de las muestras. El ADN fue secuenciado por la empresa Stab Vida a partir de oligonucleótidos sintetizados por Integrated DNA Technologies (tabla M8). Los clones 16 y 45 fueron secuenciados con los cuatro primers, mientras que los clones 3, 17, 21, 26 y 54 solo lo fueron con el UppeRAD51BamHI, LopostRAD51HindIII y RevRAD51in.

Tabla M8. Oligonucleótidos empleados para secuenciar.

Oligonucleótidos	Secuencia
UppreRAD51BamHI	TTACTCGGATCCTTTCACCACAATTCGCAAGA
LopostRAD51HindIII	TTACTCAAGCTTAGCTCCAATTCAGGGTATG
RevRAD51in	GAACCAAGTTTCCACACCACC
LopostRAD51	CAACCTAAGAAAAAGAGGAG

4.7. Análisis de sensibilidad a agentes genotóxicos

La sensibilidad a MMS, radiación γ , zeocina e hidroximetilurea se analizó mediante un ensayo de gotas de diluciones seriadas (1/10) a partir de colonias independientes resuspendidas en 1 mL de agua destilada. El número de células se determinó mediante conteo en una cámara Bürker, y se normalizó para partir del mismo número en todas las muestras. Finalmente se inocularon 4 μ L de cada concentración en placas con y sin MMS, zeocina o hidroximetilurea a las concentraciones indicadas. Para el estudio de la sensibilidad a radiación γ se inocularon 4 μ L de cada dilución en placas con medio SMM-H que posteriormente fueron irradiadas a 150, 300 y 450 Gy.

4.8. Análisis de contenido de ADN mediante citometría de flujo (FACS)

El contenido de ADN se determinó mediante análisis por FACS de cultivos de células en fase exponencial. Para ello, se recogió por centrifugación a máxima velocidad 1 mL de células que se fijaron con 1 mL de etanol 70%. Posteriormente, las células se lavaron con PBS 1x, se resuspendieron en PBS 1x + RNasa (10 mg/mL), y se incubaron a 37°C O/N. Al día siguiente se volvieron a lavar con PBS 1x y se resuspendieron en PBS 1x con yoduro de propidio 5 μ g/mL durante 1 hora en ausencia de luz. Por último, las muestras se sonicaron (Digital Sonifier-Branson) durante 3 segundos a 10 mA y se analizaron en un citómetro de flujo BD FACSCalibur™- BD Biosciences.

4.9. Amplificación de ADN por PCR

La amplificación por PCR se realizó en un termociclador T100™- BIORAD. Para la misma se emplearon la polimerasa termoestable Velocity (Bioline) y oligonucleótidos sintetizados por Integrated DNA Technologies y Metabion. Para un volumen de 50 μ L de reacción, se añadieron los siguientes componentes:

2,5 µL Forward primer (0,5 µM)
2,5 µL Reverse primer (0,5 µM)
10 µL PCR Buffer (con Mg ²⁺) (1x)
1 µL dNTP (100 mM)
1 µL enzima Velocity
1 µL ADN
32 µL H ₂ O Milli-Q®

Las condiciones de cada ciclo de amplificación fueron:

	Fase	Temperatura (°C)	Tiempo (minutos)
	Desnaturalización previa	98	2
x34	Desnaturalización	98	0,5
	Hibridación	52	0,5
	Extensión	72	3
	Extensión final	72	5

Tabla M9. Oligonucleótidos con los que se amplificó.

Oligonucleótidos	Secuencia
Rad51 up DH C1	ATGATGCCCCGGGATGTCTCAAGTTCAAGAACAACATATATCAGAGTCACAGC
Rad51 lo DH C1	ATATGCAGATCTCTACTCGTCTTCTCTCTGGGGTCACCAACACCATCTTCA
UpRad54 C2	ATGATGGAATTCATGGCAAGACGCAGATTACC
LoRad54 C2	ATATGCCTGCAGTCAATGTGAAATATATTGAA

4.10. Digestión de ADN

Las digestiones de ADN se realizaron a 37°C durante 1-2 horas en la siguiente mezcla de reacción:

Para 1 muestra:

2 µL ADN
0.5 µL R10*
2 µL Buffer 1x
0.5 µL enzima restricción
15 µL H ₂ O Milli-Q®

**Para los productos de PCR no se añadió R10*

4.11. Purificación de ADN

El ADN se purificó utilizando el Isolate II PCR and Gel Kit (Bioline) tras la separación de las bandas de ADN mediante electroforesis en gel de agarosa al 0.8%.

5.-RESULTADOS Y DISCUSIÓN

5.1.- Caracterización de los mutantes de *RAD51* de separación de funciones

5.1.1. Clonación de los alelos de *RAD51*

Como se ha indicado anteriormente, tras la búsqueda de mutantes de separación de funciones se consiguieron aislar 7 candidatos sensibles a MMS y resistentes a radiación γ , lo cual sugiere que están afectados principalmente en la función replicativa. Estos mutantes fueron los candidatos 3, 16, 17, 21, 26, 45 y 54. En primer lugar, decidimos confirmar que el fenotipo observado estaba asociado a mutaciones en el gen *RAD51*.

Para ello, procedimos a clonar los plásmidos con los alelos de *RAD51*. Realizamos una extracción de ADN total de los mutantes con un protocolo que enriquece en ADN plasmídico. A continuación transformamos bacterias competentes con el ADN extraído de los siete candidatos, así como con el plásmido pBR322 como control positivo para determinar la eficiencia de la transformación. Como control negativo realizamos una transformación sin ADN. Las muestras se sembraron en placas con medio LB+Ampicilina para seleccionar las bacterias transformadas con el plásmido, obteniéndose decenas de transformantes en todas las placas excepto la del control negativo, donde no se obtuvieron colonias.

Posteriormente, realizamos una extracción de ADN plasmídico de dos clones de bacterias independientes por candidato. Los plásmidos fueron confirmados molecularmente mediante digestión con las enzimas *Bam*HI y *Hind*III (New England BioLabs® Inc.) y análisis de los productos obtenidos en geles de agarosa. Los patrones de restricción se compararon con los del plásmido pRS51S, que porta una copia de *RAD51* silvestre, y los del plásmido vacío pRS313. El patrón de los clones se correspondió con el del plásmido pRS51S (Figura 6), de acuerdo con lo esperado si los mutantes llevan un alelo de *RAD51* (Figura 5).

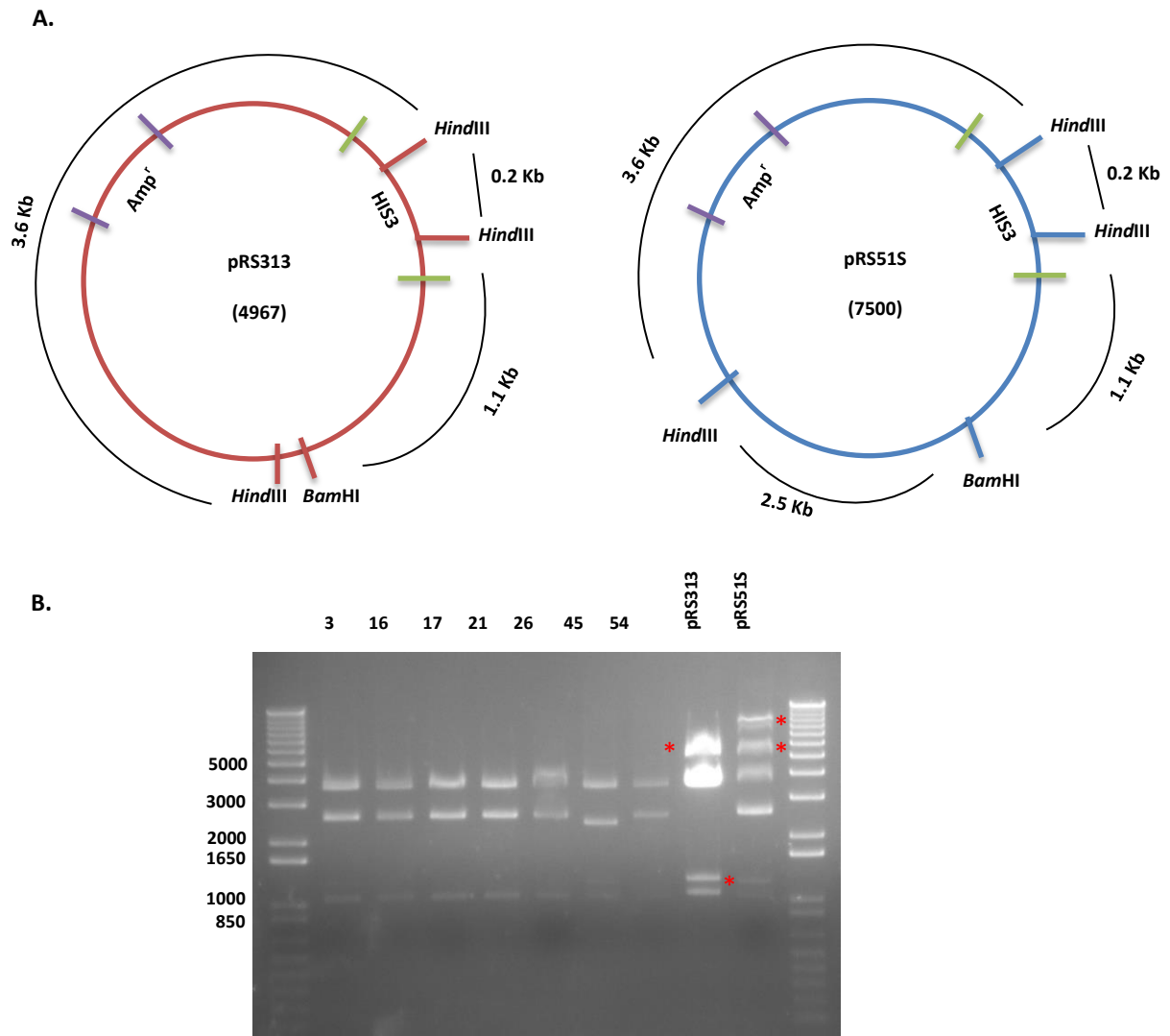


Figura 6. Mapa de pRS313 y pRS51S (**A**) y patrón de restricción de los plásmidos de los alelos mutantes, de pRS313 (control negativo) y de pRS51S (control positivo) tras su digestión con *Bam*HI y *Hind*III (**B**). El fragmento esperado de 190 pb no se detectó por falta de ADN. Los * indican digestiones parciales.

5.1.2.-Análisis de la sensibilidad a MMS y radiación y de los mutantes

Con el objetivo de confirmar que el fenotipo de sensibilidad a agentes genotóxicos de los mutantes estaba asociado a los alelos de *RAD51* de los plásmidos clonados, realizamos una transformación de levaduras con fondo genético *rad51Δ* con el ADN extraído, el plásmido pRS51S (control positivo), el plásmido pRS313 o sin plásmido (controles negativos). Las muestras se sembraron en placas con medio SMM-H para seleccionar las levaduras transformadas con el plásmido, obteniéndose varios cientos de transformantes en todas las placas a excepción de la transformación sin ADN.

Posteriormente realizamos un análisis de sensibilidad de los mutantes a MMS y radiación γ y mediante rayas de tres colonias independientes por cada transformación. Como se observa en la figura 7, el plásmido pRS51S (*RAD51*), pero no el plásmido pRS313 (vacío), complementó los defectos de sensibilidad a MMS y radiación γ de la estirpe *rad51Δ*. De igual manera, los candidatos presentaron un fenotipo general de sensibilidad a MMS y resistencia a radiación γ , si bien aparecieron distintos grados de sensibilidad y/o resistencia. Así, el clon 26 mostró muy poca sensibilidad a MMS, mientras que el 21 fue bastante sensible a radiación γ . Por tanto, decidimos realizar una caracterización más cuantitativa de la sensibilidad de los mutantes a estos agentes mediante ensayos de gotas con diluciones seriadas (Figura 8). En este estudio incluimos, además de MMS y radiación γ , la droga zeocina, agente genotóxico que induce DSBs (35,36).

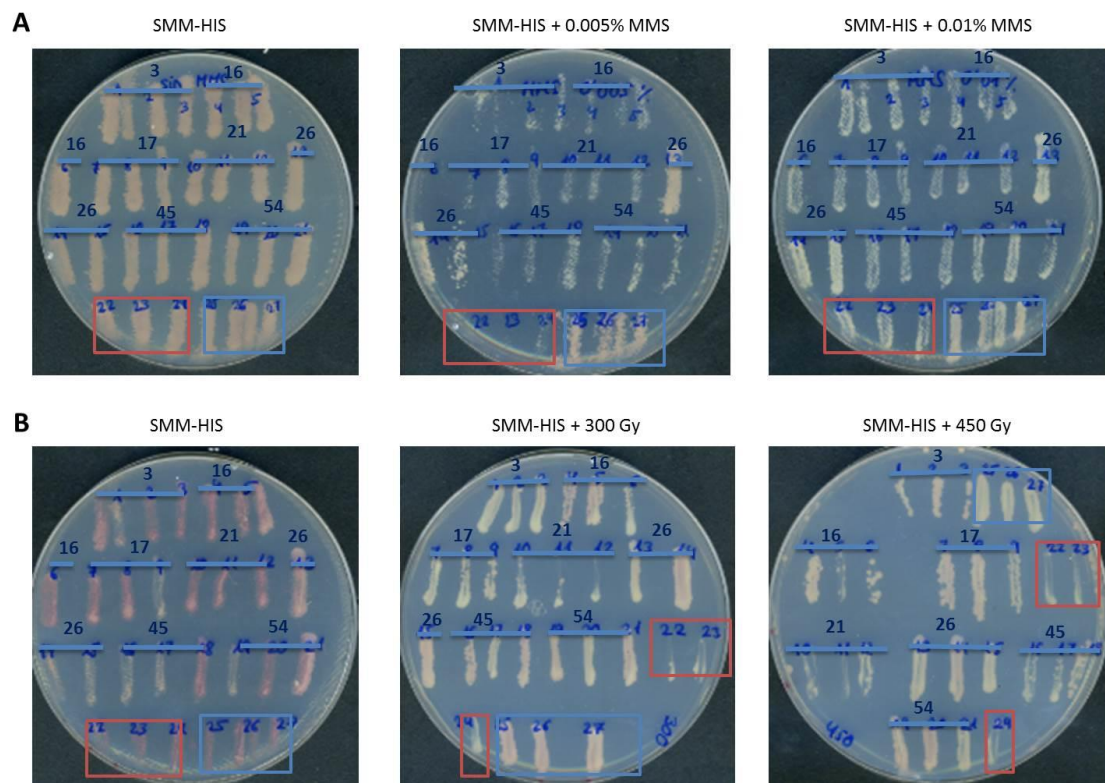


Figura 7. Análisis por triplicado de La sensibilidad a MMS (A) y radiación γ (B) de los mutantes de *rad51* (líneas azules). Los controles negativo (pRS313) y positivo (pRS51S) están señalados con cuadrados rojos y azules, respectivamente.

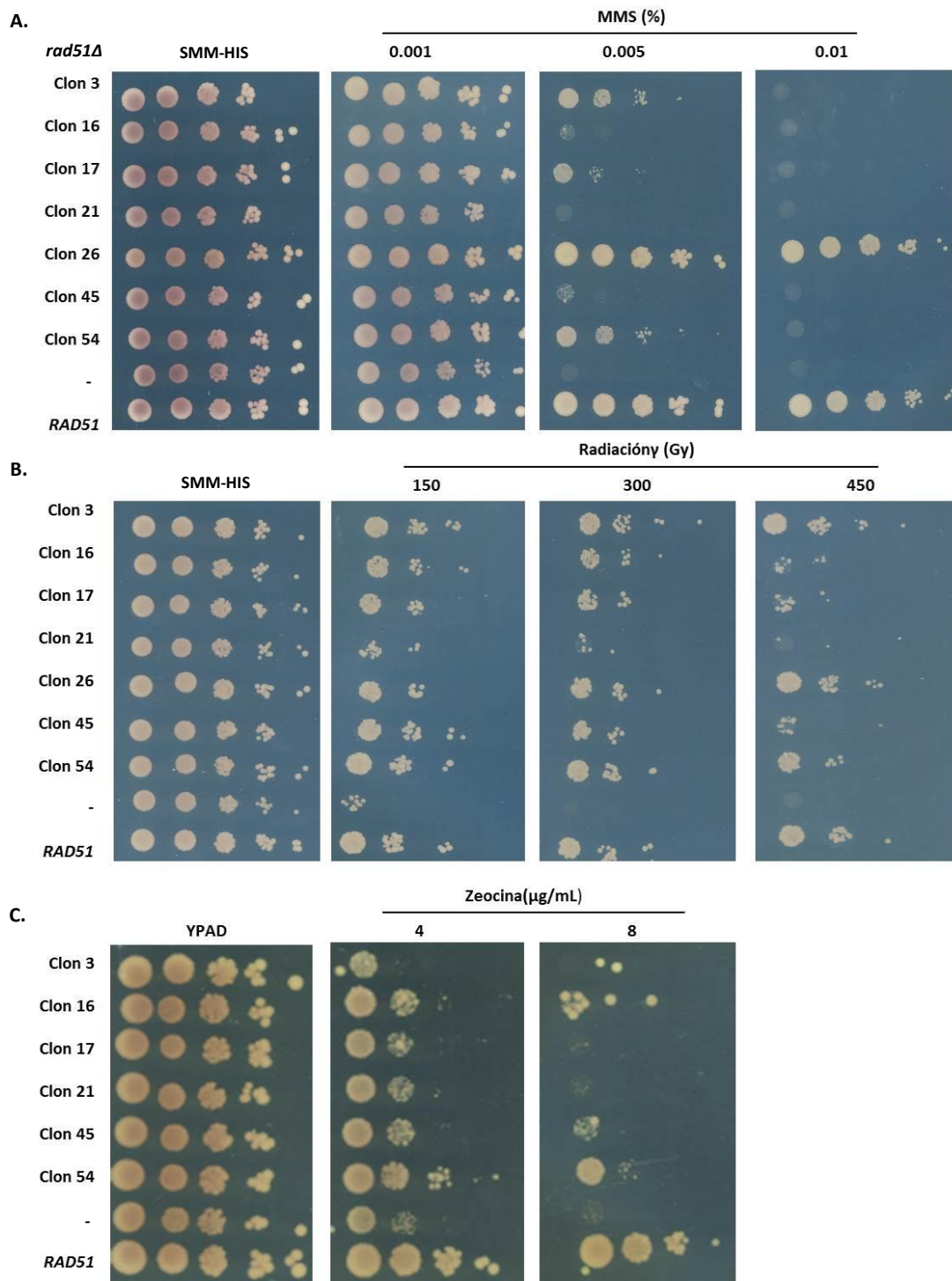


Figura 8. Análisis mediante ensayo de gotas de la sensibilidad de la estirpe *rad51Δ* transformada con los diferentes clones de *rad51* a MMS (A), radiación y (B), y zeocina (C). Como controles positivo y negativo se usaron los clones transformados con pRS51S (*RAD51*) y pRS313 (vacío), respectivamente. El candidato 26 no fue incluido en el ensayo de zeocina por mostrar un fenotipo de resistencia a MMS.

<i>rad51Δ</i>	MMS	Radiación γ	Zeocina
<i>RAD51</i>	++++	++++	++++
-	-	-	-
3	++	++++	-
54	++	++++	+/-
16	-	++	+/-
45	-	++	+/-
17	+	++	-
26	++++	++++	nd
21	-	-	-

Tabla 1. Grado de sensibilidad a los agentes genotóxicos MMS, radiación γ y zeocina de los mutantes analizados. La puntuación ++++ indica una resistencia equivalente a la del alelo silvestre, mientras que – indica una sensibilidad equivalente a la de la estirpe *rad51Δ*. nd, no determinado.

Este análisis confirmó que los mutantes presentan diferentes grados de sensibilidad/resistencia a estos agentes genotóxicos, los cuales se resumen en la Tabla 1. Esta información nos permitió agrupar a los distintos candidatos en varias categorías: los clones 3 y 54 son parcialmente sensibles a MMS y muy resistentes a radiación; los clones 16 y 45 son muy sensibles a MMS y medianamente resistentes a radiación; el clon 17 se encontraría en una situación intermedia a estos, mientras que el 26 volvió a mostrar un fenotipo silvestre para ambas drogas. Por último, el 21 es sensible a ambos agentes genotóxicos. Curiosamente, a pesar de ser un agente genotóxico que induce DSBs, todos los mutantes mostraron sensibilidad a zeocina. A diferencia de la radiación γ, la zeocina produce DSB principalmente de forma indirecta, dando en un primer momento lugar a cortes de cadena sencilla en el ADN que son luego convertidos en DSB como consecuencia del avance de la horquilla de replicación (35,36). Por tanto, la zeocina podría interferir con el avance de la horquilla, produciendo así daños replicativos adicionales.

5.1.3. Análisis del ciclo celular de los mutantes

Como ya se ha comentado, el hecho de que los mutantes con los que hemos trabajado sean sensibles a MMS y resistentes a radiación γ sugiere que están afectados en la función replicativa de *RAD51*. Por tanto, realizamos un análisis del ciclo celular de los mutantes para estudiar su progresión a lo largo de la fase S. Para ello determinamos su contenido de ADN por análisis por FACS mediante cinéticas en las que las células se sincronizaron en G1 y se liberaron en medio fresco hasta G2/M, tanto en ausencia como en presencia de MMS (Figura 9).

El mutante *rad51Δ* liberado en presencia de MMS presenta un enlentecimiento en la progresión a lo largo de la fase S (25). Sin embargo, aunque claramente las estirpes avanzan más lentamente en presencia de MMS, no apreciamos un enlentecimiento del ciclo en este mutante respecto al silvestre, por lo que no podemos concluir nada de los perfiles de los candidatos a partir de este experimento. Por tanto, sería necesario repetir estos análisis para poder relacionar el fenotipo de sensibilidad con la replicación en presencia de MMS.

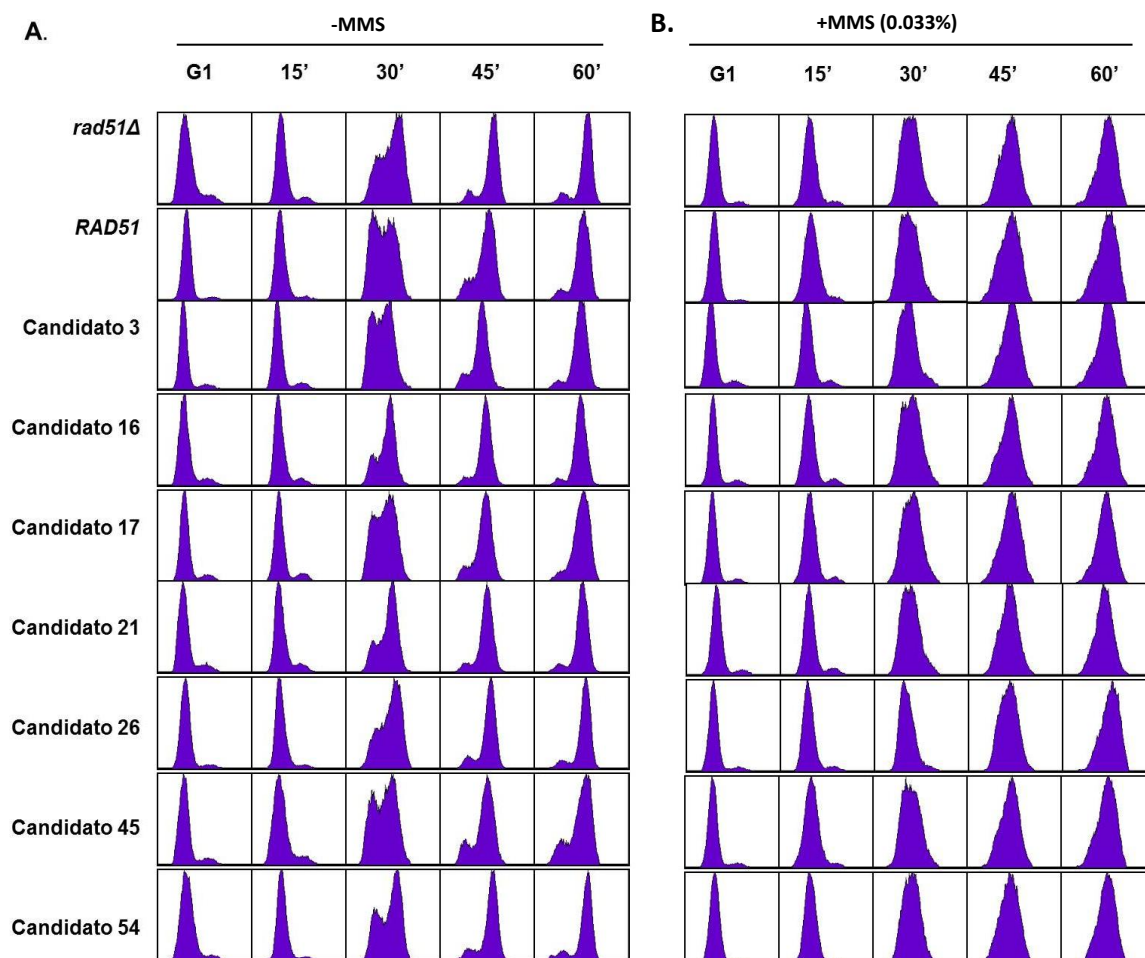


Figura 9. Análisis de progresión a lo largo del ciclo mediante estudio de contenido de ADN por FACS en ausencia (A) y en presencia de MMS al 0.033% (B) de la estirpe *rad51Δ* transformada con los diferentes clones de *RAD51*, pRS313 (vacío) y pRS51S (*RAD51*).

5.1.4.-Secuenciación de las mutaciones de *RAD51*

Para determinar los cambios en la secuencia de ADN de *RAD51* responsables de los fenotipos observados, secuenciamos el ADN plasmídico de los siete clones de interés con los oligonucleótidos recogidos en la Tabla M8 (Figura 10). A raíz de los resultados de los análisis de

WT

ATG (+1) EcoRI (625) STOP

C.3

472 885 951

A->C* (Ile->Leu) (157) A->G* (295) T->G* (Phe->Leu) (317)

C.54

162 277 306 337

T->G* (54) A->T* (Met->Leu) (92) A->G* (Glu->Gly) (100) T->A* (Ser->Arg) (102) G->T* (Ala->Ser) (112)

C.16

148 171 366 509 620

G->T (Gly->Cys) (49) G->A (57) A->G (122) T->A (Leu->His) (169) A->G* (Asp->Gly) (206)

C.45

614

C->A* (Pro->Leu) (204)

C.17

-70 34 53 179 246 265 698 759 803 1071 1116

T->G* (-70) T->A* (Ser->Thr) (11) A->T* (Asn->Ile) (17) A->G* (Gln->Arg) (59) A->C* (82) A->G* (Asn->Asp) (88) C->T* (Ala->Val) (232) T->C* (Met->Thr) (253) T->C* (Met->Thr) (267) A->T* (357) T->G* (372)

C.26

-305 -103 285 293

G->A* (-305) T->A* (-103) T->C* (95) A->T* (Lys->Ile) (97)

C.21

261 284 330 461 1132

A->G* (87) A->T* (Asp->Val) (94) A->G* (110) G->A* (Arg->Lys) (153) T->G* (377)

24

La secuenciación de estos clones es aun incompleta y requiere la confirmación de varios de los cambios. Aun así, el análisis muestra la presencia de mutaciones tanto en el dominio HhH como en el dominio RecA/Rad51 de la proteína (Figura 10).

5.1.5. Ensayo de doble híbrido

Rad51 interacciona con muchas proteínas, entre las que destacan las proteínas del grupo de epistasia de *RAD52* que incluye, aparte de a Rad51 y Rad52, a Rad54 y Rad55, y que son necesarias para la HR en *S.cerevisiae*. La búsqueda de mutantes de *rad51* afectados en la interacción de Rad51 con el resto de proteínas de este grupo de epistasia permitió definir qué zonas de Rad51 son necesarias para mantener estas interacciones (37). En la figura 11 se muestra la posición de esas mutaciones, y en colores la proteína Rad cuya interacción previenen. Todos estos mutantes mostraron un fenotipo de sensibilidad a MMS asociado a la interrupción de las interacciones proteína-proteína, lo cual da idea de la importancia que tienen estas para la supervivencia ante daño genotóxico.

Un análisis comparativo de los mutantes seleccionados por su sensibilidad a MMS y resistencia a radiación y en nuestro trabajo muestra que todos poseen mutaciones muy próximas a las mutaciones que afectan a la interacción de Rad51 con Rad54. Así, los candidatos del grupo 16/45 tienen mutaciones en los residuos 204 y 206, muy próximos a las posiciones 210 y 211. De igual manera, los candidatos del grupo 3/54 poseen mutaciones en los residuos 317 y 92, 100, 102 y 112, muy próximas a las posiciones 310 y 99, 103 y 104 (Figuras 10 y 11).

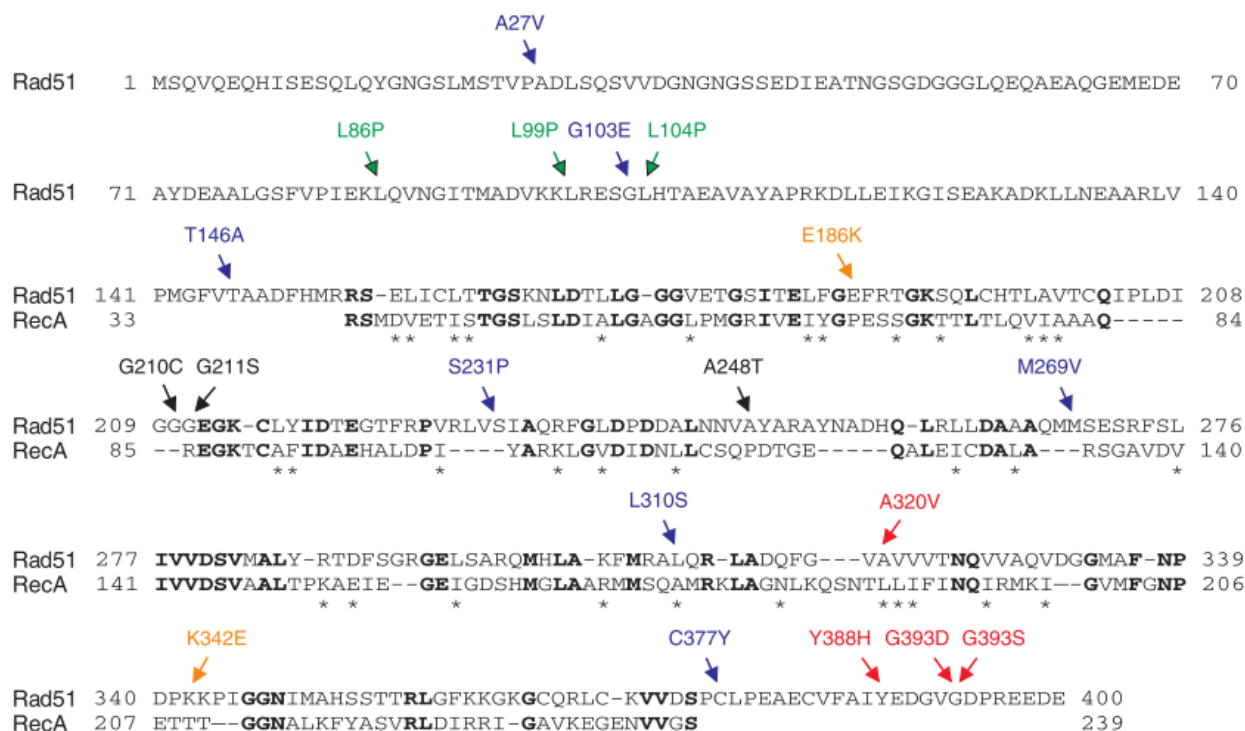


Figura 11. Secuencia aminoacídica de la proteína Rad51. Las mutaciones que afectan la interacción proteína-proteína se muestran coloreadas: las señaladas en azul hacen referencia a las que interrumpen la interacción con Rad54; las rojas, con Rad52; las negras, con Rad54 y Rad52 simultáneamente; las verdes, con Rad54 y Rad55 simultáneamente; las naranjas son mutaciones que aumentan significativamente la interacción con Rad51.

Por tanto, nos planteamos la opción de realizar un ensayo de doble híbrido con el objetivo de estudiar la interacción de los mutantes 3, 16, 45 y 54 con Rad54. Para ello, decidimos clonar los genes *RAD51* silvestre, *RAD51* mutado (de los clones 3, 16, 45 y 54) y *RAD54* silvestre en los vectores pGBAD-C1 y pGBDU-C2, que contienen los dominios de activación y unión al ADN del promotor *GAL4*, respectivamente. En este ensayo, la interacción entre las dos proteínas de interés recluta el dominio de transactivación de Gal4 a un promotor que dirige la expresión de un gen reportero (Figura 12).

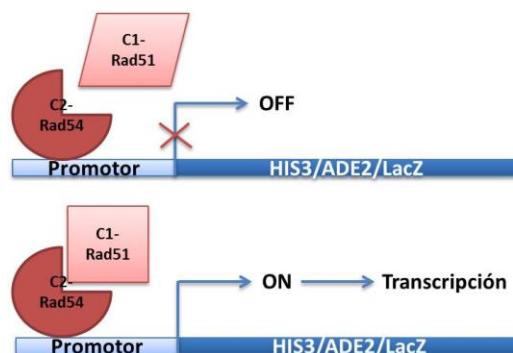


Figura 12. Estrategia para el ensayo de doble híbrido. *RAD51*, tanto silvestre como mutado, se clonaría en el vector pGBAD-C1, mientras que *RAD54* lo haría en el pGBDU-C2. Si interaccionasen se sintetizarían los factores HIS3, ADE2 y LacZ, de tal manera que luego se estudiaría el crecimiento en medio SMM-H, SMM-A y SMM+X-gal. Cuanto más crecimiento haya en estos, más fuerte será la interacción entre ambas proteínas. En caso de que no hubiera interacción no se produciría transcripción, y por tanto no se observaría crecimiento.

Por cuestiones de tiempo no hemos podido completar los clones necesarios para el ensayo. Amplificamos los genes de interés por PCR con los oligonucleótidos recogidos en la Tabla M9, que en su región terminal 5' contienen dianas para las enzimas de restricción *SmaI*, *BglII*, *EcoRI* y *PstI*, respectivamente. Una vez purificados, digerimos el producto de PCR de *RAD51* (tanto silvestre como mutado), así como el plásmido C1, con las enzimas de restricción *SmaI* y *BglII* (New England BioLabs® Inc.), y el producto de *RAD54* y el plásmido C2 con *EcoRI* y *PstI* (Takara), pero no se realizó la ligación y posterior transformación de bacterias competentes para seleccionar los clones.

5.2.- Sensibilidad a hidroxurea de los mutantes de *RAD51*

Como se comentó en la introducción, la búsqueda inicial de mutantes de *rad51* generó 67 candidatos, la mayoría de los cuales eran sensibles tanto a MMS como a radiación γ (39). Para caracterizarlos en mayor profundidad decidimos analizar su sensibilidad a hidroxurea, una droga que reduce los niveles disponibles de dNTPs, generando una parada de las horquillas replicativas por falta de sustrato (38). Para ello, en primer lugar realizamos un ensayo de sensibilidad mediante rayas de dos colonias independientes de cada uno de los 67 candidatos, y seleccionamos aquellos que mostraban resistencia a hidroxurea (datos no mostrados). Los seleccionados fueron los clones 3, 16, 17, 26, 35, 42, 43, 45 y 54, los cuales se analizaron en mayor detalle mediante ensayos de gotas con diluciones seriadas, incluyendo de nuevo en el análisis la sensibilidad a MMS y radiación γ como controles (Figura 13).

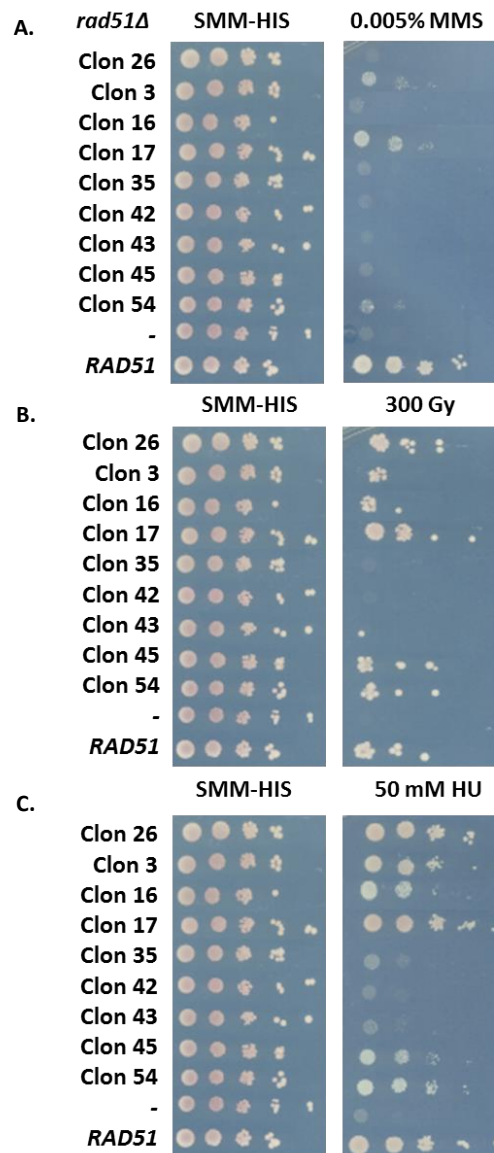


Figura 13. Caracterización de los candidatos por análisis de complementación a la sensibilidad a MMS (A), radiación γ (B) e hidroxurea (C). - se corresponde con el plásmido pRS313, y *RAD51* con el pRS51S.

Todos los candidatos mostraron sensibilidad a MMS, incluido el clon 26, lo que sugiere que haya podido haber un error en la caracterización anterior de este candidato. De acuerdo con los datos anteriores, los candidatos 3, 16, 17, 26, 45 y 54 son resistentes a γ, mientras que los clones 35, 42 y 43 son sensibles a la radiación. Es destacable que todos los candidatos sensibles a MMS y resistentes a radiación γ (3, 16, 17, 26, 45 y 54) muestren resistencia a hidroxurea, lo que sugiere que el defecto de estos mutantes es específico de los daños replicativos inducidos por MMS.

6.-CONCLUSIONES

En el presente estudio hemos caracterizado genéticamente una serie de mutantes de *RAD51* inicialmente seleccionados por ser específicamente defectivos en la respuesta a daños replicativos. Hemos demostrado que la sensibilidad a MMS de estos mutantes está asociada a mutaciones en el gen *RAD51*. Así mismo, los hemos agrupado en función a su sensibilidad y hemos observado que esta es específica de MMS pero no de otras drogas que producen estrés replicativo, como lo es la hidroxirea. Una diferencia entre ambas drogas es que el MMS causa daños en el ADN, ya que produce alquilación de bases que en último término dan lugar a ssDNA (como consecuencia de los procesos de DDT) que requieren ser rellenadas por HR. La hidroxurea, por su parte, inhibe la replicación al disminuir los dNTPs disponibles, pero no produce ningún tipo de daño directamente sobre el ADN. Esto sugiere que estos mutantes están afectados en la reparación de las lesiones de ssDNA. En cualquier caso, esta función es diferente a la requerida para reparar DSBs porque todos ellos son resistentes a radiación γ . Finalmente, el análisis de las mutaciones nos ha planteado la posibilidad de que la interacción con Rad54 se vea interrumpida en estos mutantes, lo cual podría justificar el fenotipo de sensibilidad a MMS al ser Rad54 necesaria para la reparación de daños replicativos.

7.-BIBLIOGRAFÍA

1. Aguilera A, García-Muse T. Causes of genome instability. *Annu Rev Genet* [Internet]. 2013 Jan [cited 2016 Feb 16];47:1–32. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23909437>
2. Jackson SP, Bartek J. The DNA-damage response in human biology and disease. *Nature* [Internet]. 2009 Oct 22 [cited 2014 Jul 9];461(7267):1071–8. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2906700&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
3. Mirkin E V, Mirkin SM. Replication fork stalling at natural impediments. *Microbiol Mol Biol Rev* [Internet]. 2007 Mar [cited 2016 May 5];71(1):13–35. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=1847372&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
4. Ciccía A, Elledge SJ. The DNA damage response: making it safe to play with knives. *Mol Cell* [Internet]. 2010 Oct 22 [cited 2014 Jul 11];40(2):179–204. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2988877&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
5. Liu P, Erez A, Nagamani SCS, Dhar SU, Kołodziejska KE, Dharmadhikari A V, et al. Chromosome catastrophes involve replication mechanisms generating complex genomic rearrangements. *Cell* [Internet]. 2011 Sep 16 [cited 2016 May 10];146(6):889–903. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3242451&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
6. Lee JA, Carvalho CMB, Lupski JR. A DNA replication mechanism for generating nonrecurrent rearrangements associated with genomic disorders. *Cell* [Internet]. 2007 Dec 28 [cited 2016 Apr 6];131(7):1235–47. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18160035>
7. Lettier G, Feng Q, de Mayolo AA, Erdeniz N, Reid RJD, Lisby M, et al. The role of DNA double-strand breaks in spontaneous homologous recombination in *S. cerevisiae*. *PLoS Genet* [Internet]. Public Library of Science; 2006 Nov 10 [cited 2016 May 9];2(11):e194. Available from: <http://journals.plos.org/plosgenetics/article?id=10.1371/journal.pgen.0020194>
8. San Filippo J, Sung P, Klein H. Mechanism of eukaryotic homologous recombination. *Annu Rev Biochem* [Internet]. 2008 Jan [cited 2016 May 5];77:229–57. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18275380>
9. Mortensen UH, Lisby M, Rothstein R. Rad52. *Curr Biol* [Internet]. Elsevier; 2009 Aug 25 [cited 2016 May 2];19(16):R676–7. Available from: <http://www.cell.com/article/S0960982209012330/fulltext>
10. Symington LS. Role of RAD52 epistasis group genes in homologous recombination and double-strand break repair. *Microbiol Mol Biol Rev* [Internet]. 2002 Dec [cited 2016 May 2];66(4):630–70, table of contents. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=134659&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
11. Holthausen JT, Wyman C, Kanaar R. Regulation of DNA strand exchange in homologous

- recombination. *DNA Repair (Amst)* [Internet]. 2010 Dec 10 [cited 2016 May 2];9(12):1264–72. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20971042>
12. Wang TF, Chen LT, Wang AHJ. Right or left turn? RecA family protein filaments promote homologous recombination through clockwise axial rotation. *BioEssays*. 2008;30(1):48–56.
 13. Lin Z, Kong H, Nei M, Ma H. Origins and evolution of the recA/RAD51 gene family: evidence for ancient gene duplication and endosymbiotic gene transfer. *Proc Natl Acad Sci U S A* [Internet]. 2006;103(27):10328–33. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=16798872
 14. Friedberg EC. Suffering in silence: the tolerance of DNA damage. *Nat Rev Mol Cell Biol* [Internet]. 2005 Dec [cited 2016 May 2];6(12):943–53. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16341080>
 15. Hoege C, Pfander B, Moldovan G-L, Pyrowolakis G, Jentsch S. RAD6-dependent DNA repair is linked to modification of PCNA by ubiquitin and SUMO. *Nature* [Internet]. 2002 Sep 12 [cited 2016 Feb 25];419(6903):135–41. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12226657>
 16. Prakash L. Characterization of postreplication repair in *Saccharomyces cerevisiae* and effects of rad6, rad18, rev3 and rad52 mutations. *Mol Gen Genet* [Internet]. 1981 Jan [cited 2016 May 11];184(3):471–8. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7038396>
 17. Gangavarapu V, Prakash S, Prakash L. Requirement of RAD52 group genes for postreplication repair of UV-damaged DNA in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol* [Internet]. 2007 Nov [cited 2016 May 11];27(21):7758–64. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2169055&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
 18. Vanoli F, Fumasoni M, Szakal B, Maloisel L, Branzei D. Replication and recombination factors contributing to recombination-dependent bypass of DNA lesions by template switch. *PLoS Genet* [Internet]. Public Library of Science; 2010 Nov 11 [cited 2016 May 2];6(11):e1001205. Available from: <http://journals.plos.org/plosgenetics/article?id=10.1371/journal.pgen.1001205>
 19. Prado F. Homologous recombination maintenance of genome integrity during DNA damage tolerance. *Mol Cell Oncol* [Internet]. Taylor & Francis; 2014 Oct 29 [cited 2016 May 2];1(2):e957039. Available from: <http://www.tandfonline.com/doi/full/10.4161/23723548.2014.957039>
 20. Papouli E, Chen S, Davies AA, Huttner D, Krejci L, Sung P, et al. Crosstalk between SUMO and ubiquitin on PCNA is mediated by recruitment of the helicase Srs2p. *Mol Cell* [Internet]. 2005 Jul 1 [cited 2016 May 11];19(1):123–33. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15989970>
 21. Pfander B, Moldovan G-L, Sacher M, Hoege C, Jentsch S. SUMO-modified PCNA recruits Srs2 to prevent recombination during S phase. *Nature* [Internet]. 2005 Jul 21 [cited 2016 May 10];436(7049):428–33. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15931174>

22. Veaute X, Jeusset J, Soustelle C, Kowalczykowski SC, Le Cam E, Fabre F. The Srs2 helicase prevents recombination by disrupting Rad51 nucleoprotein filaments. *Nature* [Internet]. 2003 May 15 [cited 2016 Mar 31];423(6937):309–12. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12748645>
23. Dungrawala H, Rose KL, Bhat KP, Mohni KN, Glick GG, Couch FB, et al. The Replication Checkpoint Prevents Two Types of Fork Collapse without Regulating Replisome Stability. *Mol Cell* [Internet]. Elsevier; 2015;59(6):998–1010. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.molcel.2015.07.030>
24. Hashimoto Y, Ray Chaudhuri A, Lopes M, Costanzo V. Rad51 protects nascent DNA from Mre11-dependent degradation and promotes continuous DNA synthesis. *Nat Struct Mol Biol* [Internet]. 2010 Nov [cited 2016 May 5];17(11):1305–11. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=4306207&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
25. González-Prieto R, Muñoz-Cabello AM, Cabello-Lobato MJ, Prado F. Rad51 replication fork recruitment is required for DNA damage tolerance. *EMBO J* [Internet]. 2013 May 2 [cited 2016 May 2];32(9):1307–21. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3642682&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
26. Petermann E, Orta ML, Issaeva N, Schultz N, Helleday T. Hydroxyurea-stalled replication forks become progressively inactivated and require two different RAD51-mediated pathways for restart and repair. *Mol Cell* [Internet]. 2010 Feb 26 [cited 2016 Jan 6];37(4):492–502. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2958316&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
27. Alabert C, Bianco JN, Pasero P. Differential regulation of homologous recombination at DNA breaks and replication forks by the Mrc1 branch of the S-phase checkpoint. *EMBO J* [Internet]. 2009 Apr 22 [cited 2016 May 10];28(8):1131–41. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2683710&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
28. Vázquez MV, Rojas V, Tercero JA. Multiple pathways cooperate to facilitate DNA replication fork progression through alkylated DNA. *DNA Repair (Amst)* [Internet]. 2008 Oct 1 [cited 2016 May 10];7(10):1693–704. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18640290>
29. Prado F. Genetic instability is prevented by Mrc1-dependent spatio-temporal separation of replicative and repair activities of homologous recombination: homologous recombination tolerates replicative stress by Mrc1-regulated replication and repair activities opera. *Bioessays* [Internet]. 2014 May [cited 2016 May 2];36(5):451–62. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=4312893&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
30. Barlow JH, Rothstein R. Rad52 recruitment is DNA replication independent and regulated by Cdc28 and the Mec1 kinase. *EMBO J* [Internet]. European Molecular Biology Organization; 2009 Apr 22 [cited 2016 May 10];28(8):1121–30. Available from: [/pmc/articles/PMC2683695/?report=abstract](http://pmc/articles/PMC2683695/?report=abstract)
31. Amberg D, Burke D, Strathern J. *Methods in Yeast Genetics: A Cold Spring Harbor*

Laboratory Course Manual, 2005 Edition (Cold Spring). {Cold Spring Harbor Laboratory Press}; 2005.

32. Hanahan D. Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *J Mol Biol* [Internet]. 1983 Jun 5 [cited 2015 Jan 11];166(4):557–80. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6345791>
33. Sikorski RS, Hieter P. A system of shuttle vectors and yeast host strains designed for efficient manipulation of DNA in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* [Internet]. 1989 May [cited 2016 Mar 30];122(1):19–27. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=1203683&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
34. Gietz RD, Schiestl RH, Willems AR, Woods RA. Studies on the transformation of intact yeast cells by the LiAc/SS-DNA/PEG procedure. *Yeast* [Internet]. 1995 Apr 15 [cited 2015 Sep 13];11(4):355–60. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7785336>
35. Burger RM. Cleavage of Nucleic Acids by Bleomycin. *Chem Rev* [Internet]. American Chemical Society; 1998 May [cited 2016 May 13];98(3):1153–70. Available from: <http://dx.doi.org/10.1021/cr960438a>
36. Povirk LF. DNA damage and mutagenesis by radiomimetic DNA-cleaving agents: bleomycin, neocarzinostatin and other enediynes. *Mutat Res* [Internet]. 1996 Aug 17 [cited 2016 May 13];355(1-2):71–89. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8781578>
37. Krejci L, Damborsky J, Thomsen B, Duno M, Bendixen C. Molecular dissection of interactions between Rad51 and members of the recombination-repair group. *Mol Cell Biol*. 2001;21(3):966–76.
38. Koç A, Wheeler LJ, Mathews CK, Merrill GF. Hydroxyurea arrests DNA replication by a mechanism that preserves basal dNTP pools. *J Biol Chem* [Internet]. 2004 Jan 2 [cited 2016 May 5];279(1):223–30. Available from: <http://www.jbc.org/content/279/1/223.abstract>
39. Roldán JM, Morillo M, Prado F. Búsqueda de mutantes de *RAD51* de separación de funciones replicativa y reparacional [Tesis Fin de Máster (inédita)]. Sevilla: Universidad de Sevilla. Facultad de Biología; 2015.